

⑪ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 784 898

⑫ N° d'enregistrement national : **98 13473**

⑫ Int Cl⁷ : A 61 K 38/18, A 61 P 27/02

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 26.10.98.

⑫ Priorité :

⑫ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 28.04.00 Bulletin 00/17.

⑫ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑫ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑫ Demandeur(s) : UNIVERSITE LOUIS PASTEUR —
FR.

⑫ Inventeur(s) : SAHEL JOSE, FRASSON MARIA,
PICAUD SERGE, HICKS DAVID, MOHAND SAID SAD-
DEK et LEVEILLARD THIERRY.

⑫ Titulaire(s) :

⑫ Mandataire(s) : NUSS.

⑫ UTILISATION DU GDNF POUR LE TRAITEMENT DE LA DEGENERESCENCE RETINIENNE.

⑫ La présente invention a pour objet l'utilisation du fac-
teur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF), ou
d'une substance de la famille comprenant ledit facteur, en
tant qu'agent actif protecteur pour le traitement des dégéné-
rescences rétinienues, plus particulièrement de la rétinite
pigmentaire (RP) chez l'homme.

FR 2 784 898 - A1



DESCRIPTION

La présente invention concerne le domaine des traitements de certaines maladies rétinienne, plus particulièrement les agents susceptibles d'agir dans le cadre de ces traitements, et a pour objet l'utilisation du facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales à cette fin.

5 La rétinite pigmentaire (RP) correspond à un groupe de maladies rétinienne héréditaires induisant la perte progressive des photorécepteurs et un handicap visuel extrême.

Il n'y a à ce jour pas de traitement connu pour ces maladies, qui peuvent être causées par de nombreuses mutations dans une variété de gènes spécifiques des photorécepteurs (rhodopsine, cGMP-phosphodiesterase).

10 Plusieurs solutions possibles de traitements sont actuellement à l'étude pour limiter ou prévenir la perte des photorécepteurs associée à cette maladie, à savoir, la thérapie génique (Bennett et al., Nature Médecine 1996, 2 : 649-654), les traitements pharmacologiques (c'est-à-dire l'application de facteurs de croissance : Steinberg, Curr. Opinion in Neurobiology 1994 ; 4 : 515-524) et la transplantation rétinienne (Del Cerro, J. Neural Transplantation 1989 ; 1 : 1-10 / Mohand-Saïd et al., Opthal. Res. 1997 ; 29, 290).

Parmi ces approches, l'utilisation des facteurs de croissance a été envisagée depuis la publication précitée de Steinberg et al., qui ont montré que des injections intraoculaires de facteur de croissance fibroblastique basique (FGF-2) retardaient la dégénérescence des photorécepteurs dans un modèle animal des RP, le rat RCS (Royal College of Surgeons) (Faktorovich et al., Nature 1990 ; 347, 83). Les mêmes auteurs ont publié des données montrant que plusieurs facteurs de croissance, y compris le FGF-2 et le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) (Lavail et al., Invest.Ophthalmol.Vis.Sci., 1998 ; 39 : 592-602), exerçaient des effets bénéfiques sur la survie des photorécepteurs chez le rat dans la dégénérescence des photorécepteurs (Faktorovich et al., J. Neuroscience 1992 ; 12, 3554 / Steinberg, Curr. Opinion Neurobiology 1994 ; 4, 515).

20 En ce qui concerne le GDNF, son ARN messenger est produit dans la rétine. Les cellules rétinienne expriment ces récepteurs et il a une activité stimulante sur la survie de photorécepteurs in vitro isolés à partir de rats nouveau-nés (Jing et al., Cell 1996 ; 85, 1113).

Toutefois ces résultats n'autorisent aucune déduction valable sur les effets que pourraient avoir le GDNF sur la dégénérescence de photorécepteurs in

- 2 -

vivo sur des modèles pathologiques qui ne sont pas mentionnés dans cet article, et en particulier chez la souris, espèce porteuse de mutations analogues à celles rencontrées en pathologie humaine.

Ceci est d'autant plus vrai qu'il a été constaté que le CNTF exerce des effets contraires sur les photorécepteurs de poulets et sur les photorécepteurs de rats (Kirsch et al., Neuroreport 1996 ; 7, 697) et que le FGF-2 protégeait les photorécepteurs dans la dégénérescence héréditaire dans la rétine de rats mais pas dans la rétine de souris (Faktorovich et al., Nature 1996 ; 381, 789).

De plus, les résultats précités (Jing et al., 1996) ont été observés in vitro en culture monocouches de cellules immatures, et n'autorisent aucune déduction en termes d'effets dans les conditions résultant de l'environnement complexe de la rétine entière mature chez l'animal.

Enfin, toutes ces publications se réfèrent uniquement aux photorécepteurs de type bâtonnet et aucune ne mentionne un quelconque effet au niveau des photorécepteurs du type cône qui sont pourtant essentiels pour la vision des couleurs et l'acuité visuelle, ni une quelconque influence sur la fonction visuelle.

Par ailleurs, les résultats obtenus in vitro avec le GDNF ne semblent pas avoir été jugés suffisamment concluants pour que ce facteur neurotrophique soit pris en considération dans les études et les essais systématiques récents relatifs aux effets d'un grand nombre de facteurs de survie des photorécepteurs dans la dégénérescence rétinienne (La Vail et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, March 1998, vol 39, n° 3, 592-602).

Or les auteurs de la présente invention ont constaté et pu observer que le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF) présentait, in vivo, un effet protecteur contre la dégénérescence des photorécepteurs sur un animal mutant, modèle de rétinopathie pigmentaire humaine, cet effet protecteur s'appliquant autant aux bâtonnets qu'aux cônes et indiquant une préservation de la fonction visuelle, au moins partielle.

Ainsi, le principal objet de la présente invention consiste en l'utilisation du facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF) ou d'une substance de la famille du GDNF, en tant qu'agent actif protecteur tant au niveau structurel qu'au niveau fonctionnel, pour le traitement des dégénérescences rétiniennes, plus particulièrement de la rétinopathie pigmentaire (RP) chez l'homme.

L'obtention d'une substance active protectrice contre les effets des dégénérescences rétiniennes n'est pas limitée au seul GDNF, mais peut être étendue, selon les recherches menées par les inventeurs, au moins à certaines des

- 3 -

substances faisant partie de la famille du GDNF, telles que par exemple la neurture ou le TGFB.

Selon une première variante de réalisation de l'invention, le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales est administré par injection intra-oculaire sous-rétinienne et consiste en du GDNF exogène recombinant.

Conformément à un second mode de réalisation de l'invention, le GDNF peut être libéré in situ par exemple par des fibroblastes implantés par greffage, après transfection.

De plus, il convient de noter que le GDNF constitue une molécule neuroprotectrice particulièrement intéressante en ce qui concerne sa tolérance et ses effets secondaires car, contrairement au FGF-2, il n'est pas angiogénique et n'entraîne pas normalement de complications néovasculaires.

Les effets in vivo du GDNF mentionnés ci-dessus ont été vérifiés à l'aide des tests décrits ci-après, en relation avec les figures 1 à 6 des dessins annexés.

Ces figures montrent plus particulièrement :

Figure 1 (Figures 1A et 1B) : Evolution des ERG (électrorétinogrammes) de souris de type sauvage et rd/rd en réponse à une stimulation mésopique.

Figure 2 : Persistance des ERG à un niveau détectable dans des souris rd/rd âgées de 21 et 24 jours ayant reçu une injection de GDNF et leur disparition dans des souris identiques ayant reçu une injection de PBS. (Figure 2A) Histogrammes montrant les amplitudes des ondes a et b d'ERG observées sur des animaux distincts. (Figure 2B) Enregistrement d'ERG sur des yeux ayant reçu une injection de GDNF.

Figure 3 : Vue à faible grossissement de rétines rd/rd entières mises à plat ayant reçu une injection de PBS (Figure 3A) et de GDNF (Figure 3B), immunomarquées par rho-4D2. Les photorécepteurs de type bâtonnet survivants à la suite de traitement par GDNF sont nettement plus nombreux. Cet exemple est représentatif de la souris qui présente le plus gros écart numérique entre l'oeil traité par GDNF et l'oeil controlatéral ayant reçu une injection de PBS. Barre d'échelle = 50 μ m.

Figure 4 : Illustration de l'approche d'échantillonnage aléatoire systématique utilisée (Figure 4A) et vue à fort grossissement de la rétine rd/rd immunomarquées montrant l'allure des bâtonnets et du cadre de comptage superposé (Figure 4B). Barre d'échelle (Figure 4B) = 10 μ m.

- 4 -

Figure 5 (Figures 5A et 5B) : Comptages de bâtonnets immunomarqués dans des souris rd/rd traitées par GDNF, PBS et non traitées. (Figure 5A) Nombre total de bâtonnets survivants pour chaque souris prise individuellement ayant reçu une injection de GDNF dans un oeil (barres blanches) et du véhicule PBS dans l'autre (barres noires). L'effet bénéfique reproductible du traitement par le facteur de croissance en comparaison avec des yeux ayant reçu une injection de véhicule peut être observé. Les souris ayant permis l'enregistrement réussi d'ERG étaient numérotées 3, 4, 7 et 9. Les nombres totaux de bâtonnets survivants pour les rétines rd/rd non opérées prélevées sur un autre groupe de 5 souris sont présentés dans les colonnes 11 à 15 (barres noires). Il est constaté que l'intervention chirurgicale a conduit elle-même à une variation du nombre de bâtonnets par rapport aux yeux non opérés, et que l'injection de PBS a généré une légère protection des bâtonnets. (Figure 5B) Nombres moyens (moyenne +/- écart type) des bâtonnets calculés d'après (Figure 5A). L'élévation des nombres de bâtonnets à la suite de traitement par GDNF par rapport à des témoins non traités et ayant reçu un traitement par PBS est bien visible.

Figure 6 : L'expression d'ARNm de GDNF n'est pas altérée durant la dégénérescence de photorécepteurs chez la souris rd/rd. L'expression d'ARNm de GDNF a été suivie par RT-PCR semi-quantitative. (Figure 6A) L'expression de GDNF a été comparée entre rétines par rapport au reste de l'oeil. L'ARN total a été isolé à partir de rétines rd/rd (pistes 1, 3) et du reste de l'oeil (pistes 2, 4) et analysé avec des amorces spécifiques de GDNF (1, 2) et de G6PDH (3, 4). (Figure 6B) Les ARN totaux isolés à partir d'yeux entiers prélevés sur des souris rd/rd âgées de 12, (pistes 1, 12, 23) ; 22 (pistes 2, 3, 13, 14, 23, 24) ; 28 (pistes 4, 5, 15, 16, 26, 27) ; 35 (pistes 6, 7, 17, 18, 28, 29) et 120 jours post-natal (pistes 8, 9, 19, 20, 30, 31), et à partir de souris normales (C57BL/6) âgées de 35 jours post-natal (pistes 10, 11, 21, 22, 23, 32, 33) ont été analysés avec des amorces spécifiques du gène de la rhodopsine (RHO-1 - 11), de GDNF (12 - 22) et du gène d'entretien codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, 23 - 33). La réduction des taux d'ARNm codant pour la rhodopsine, et le profil uniforme des taux d'ARNm à expression constante codant pour GDNF et G6PDH, peuvent être observés.

1) Matériaux et Méthodes utilisés

a) Animaux :

Des souris C3H/He/J homozygotes pour le gène de la dégénérescence rétinienne (rd) (souris rd/rd) et des souris témoins C57/BL6/J âgées de 12, 15, 17, 19 et 25 jours ont été obtenues auprès de l'établissement Janvier pour la fourniture d'animaux de laboratoire (Le Genest, St. Isle, France),

- 5 -

maintenues dans des cages en plastique transparent et soumises à des cycles diurnes standards de 12 heures. Tous les protocoles étaient conformes à la Résolution ARVO concernant l'utilisation et la prise en charge des animaux à des fins de recherche.

5 b) Application in vivo de GDNF à des souris rd/rd :

Des injections de GDNF ont été pratiquées à des souris C3H âgées de 16 et 20 jours. Les souris (n=10) ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale (16,7 µl/g de poids corporel) d'étomidate (0,5 mg/ml) et de midazolane (0,5 mg/ml). Les pupilles ont été dilatées en appliquant de la
10 tropicamide à 0,5 %, et les cornées ont été anesthésiées par de la propocaïne à 0,5 % pour application topique. Un µl de GDNF (GDNF humain recombinant) de la société Promega, Madison, IL, EUA (330 ng/µl) dans du tampon salin phosphate stérile (PBS) 0,1 M a été injecté au moyen d'une seringue du type Hamilton munie d'une aiguille de calibre 30 à une distance de 1 mm du limbe
15 cornéen dans l'espace sous-rétinien. L'oeil controlatéral a reçu une injection identique en volume d'une solution de PBS uniquement.

Il était nécessaire de procéder à une chirurgie oculaire bilatérale afin de distinguer l'effet protecteur dû au GDNF lui-même de celui dû à la procédure expérimentale. Dans de rares cas, un phénomène de reflux partiel a été observé.
20 Après injection, il a été procédé à un examen du fond de l'oeil pour confirmer l'induction d'un décollement local de la rétine.

c) Enregistrements Electrorétinographiques (ERG) chez la souris rd :

Des ERG ont été pratiqués au moyen d'une mèche en coton reliée à une électrode Ag:AgCl en appliquant de l'eau physiologique à l'apex de la cornée à
25 l'aide d'un micro-manipulateur. Une électrode de référence en acier inoxydable a été insérée sous la peau au sommet de la tête. Les réponses ont été amplifiées par un facteur de 10000 et filtrées à l'aide de filtres avec des seuils de résolution bas de 0,1 Hz et haut de 1000 Hz, respectivement présents sur l'amplificateur de la société Universal Gould Amplifier. Les réponses ont été numérisées en utilisant
30 une carte d'interface de type connu sous la désignation labmaster (Scientific Solutions, USA), relié à un micro-ordinateur type PC. Les données expérimentales ont été recueillies et analysées en utilisant des ensembles de logiciels du type connu sous les désignations Patchit et Tack.

Suite à une période d'acclimatation à l'obscurité de 24 heures, les
35 souris ont été préparées sous éclairage rouge de faible intensité. Elles ont été anesthésiées comme décrit ci-dessus et placées dans une cage de Faraday, la tête étant soutenue par un support en forme de U. Les paupières supérieures et

- 6 -

inférieures ont été ramenées en arrière pour maintenir l'oeil ouvert en état d'exophtalmose. Le stimulus lumineux a été obtenu grâce à une lampe à quartz-xénon (de la société Müller Instruments, RFA). Le faisceau lumineux a été focalisé à l'infini à travers un filtre thermoabsorbant vers un trou pratiqué sur la cage de Faraday. L'intensité lumineuse du faisceau était de $2,9 \log \text{ cd/m}^2$ telle que mesurée par un luxmètre au niveau de l'oeil. Un obturateur piloté par ordinateur a été utilisé pour délivrer des éclairs d'une durée de 300 ms. Pour les souris ayant reçu une injection de GDNF, des enregistrements ont été obtenus successivement à partir de chaque oeil sans que l'expérimentateur ne sache lequel des deux yeux avait reçu une injection de GDNF.

d) Marquage Immunohistochimique des bâtonnets :

Les souris ont été sacrifiées en leur administrant une surdose d'anesthésique suite à des enregistrements ERG à 25 jours. Des yeux non opérés ont été aussi prélevés sur cinq autres souris rd/rd. Les cupules optiques ont été retirées et fixées dans du paraformaldéhyde à 4 %. Les rétines ont subi un immunomarquage avec un anticorps anti-rhodopsine (rho-4D2) (Hicks et Molday, Exp. Eye Research 1986 ; 42, 55-71) qui colore de manière spécifique les photorécepteurs en forme de bâtonnets. Les rétines ont été lavées trois fois au PBS, perméabilisées dans du PBS contenant 0,1 % de Triton X-100, mises à incuber avec l'anticorps rho-4D2 ($10 \mu\text{g}/\text{MI}$) pendant une heure, lavées et mises à incuber ensuite avec une igG anti-souris de chèvre couplée au Texas Red ® (Jackson Laboratoires, West Grove, PA) pendant une heure. Les rétines ont été lavées et mises à plat dans du PBS/glycérol (50/50 vol./vol.) en orientant la couche de photorécepteurs vers le haut.

e) Comptages cellulaires :

La technique de quantification utilisée consistait en une approche stéréologique permettant un échantillonnage non biaisé (Gundersen et al., APMIS 1988 ; 96, 379). Les cellules immunomarquées ont été observées avec un microscope de type Nikon Optiphot 2 sous éclairage épifluorescent à l'aide d'un objectif 40/070 DIC (160/0,17). 120 champs de $8000 \mu\text{m}^2$ ont été sélectionnés sur toute la surface rétinienne (environ 13 mm^2) en utilisant un encodeur monté sur plateau et une procédure aléatoire systématique (Gundersen et al., 1988). Les champs ont été visualisés avec une caméra à écran graphique en couleur de type Sony ® trinitron et numérisés à l'aide du logiciel Automator pour Windows ® de la société Biocom.

Dans chacun des 120 champs, les cellules ont été comptées dans deux cadres de comptage non biaisé de $900 \mu\text{m}^2$ de surface générés par le logiciel.

- 7 -

Le nombre total de cellules en forme de bâtonnets sur toute la surface rétinienne a été estimé en divisant les valeurs obtenues par la surface rétinienne totale mesurée par un système d'analyse d'images de type Optiscan (Macintosh LC II Ci) de manière à obtenir des valeurs standardisées.

5 f) Analyse de l'ARNm de GDNF par une réaction de polymérisation en chaîne couplée à une transcription inverse (RT-PCR) :

L'ARN total a été isolé avec un kit d'extraction ARN/ADN de la société Quiagen (Valencia, CA, EUA) en adoptant un protocole standard. Les échantillons d'ARN (1µg) ont été mis en contact avec une amorce hexamère statistique et mis à incuber pendant 2 heures à 37° C avec de la transcriptase inverse du Virus de la Leucémie Murine de Moloney. 1/20ème (2 µl) de l'ADNc a été amplifié en procédant à 35 cycles avec des couples d'amorces spécifiques. Les séquences des amorces lues de 5' en 3' étaient :

rhodopsine, AAGCCGATGAGCAACTTCC,
15 TCATCTCCCAGTGGATTCTT ; GDNF, ACCAGATAAACAAGCGGCAG,
TCAGATACATCCA CACCGTTTAG ; glucose-6-phosphate déshydrogénase
(MG6PDH), GCAGTCACCAAGAACATTCAAG,
CCCAAATTCATCAAAATAGCCC.

2) Résultats

20 a) Electrorétinogrammes :

La figure 1 illustre l'évolution parallèle de l'ERG des souris de type sauvage (C57) et rd/rd. Chez les souris de type sauvage, l'amplitude des ondes a et b croît régulièrement depuis le jour 12 jusqu'au jour 24 post-natal. Chez les souris rd/rd, l'ERG était semblable à celui de type sauvage au jour 12 post-natal mais par la suite les ondes a et b ont vu leur amplitude diminuer progressivement à compter du jour 15 post-natal, au point de devenir indétectables au bout de 24 jours (Figure 1).

Afin de déterminer si le GDNF est capable d'améliorer les fonctions visuelles chez les souris rd/rd, des injections de ce facteur trophique ont été pratiquées dans l'espace sous-rétinien aux jours 16 et 20, en conjonction avec des injections de PBS comme véhicule dans l'oeil controlatéral à titre de témoins. Les animaux ont subi des enregistrements ERG aux jours 21 et 24 post-nataux au moment où les signaux ERG avaient complètement disparu chez les souris rd/rd.

Aucun des yeux ayant reçu du PBS n'a présenté d'ERG détectable
35 (n=10). En revanche, des ERG étaient décelables dans 4 yeux ayant reçu une infection de GDNF sur 10. (Figure 2A, numéros 3, 4, 7 et 9). Les amplitudes moyennes des ondes a et b dans le cas des souris ayant reçu une injection de

- 8 -

GDNF étaient de 8,5 et 15,5 μ V, respectivement. Un modèle représentatif d'ERG enregistré sur un oeil ayant reçu une injection de GDNF est présenté à la Figure 2B.

b) Analyses immunohistochimiques et morphométriques :

5 A la suite d'un enregistrement ERG, les animaux ayant reçu des injections de GDNF et de PBS (n= 10), et un second groupe de souris témoins d'âge identique (n=5), ont été sacrifiés et les bâtonnets ont été marqués et comptés dans des montages à plat de rétines. La Figure 3 montre une vue à faible grossissement de montages de rétines intégrales rd/rd ayant reçu une injection de
10 PBS (Figure 3A) et de GDNF (Figure 3B) immunomarquées par rho-4D2.

Les photorécepteurs en forme de bâtonnets survivants à la suite de traitement GDNF sont à l'évidence plus nombreux. Les clichés obtenus à plus fort grossissement ont montré des bâtonnets marqués en forme de petites cellules arrondies, possédant souvent un court segment externe (figure 4). Le cadre de
15 comptage stéréologique, ainsi que le principe des procédures d'échantillonnage aléatoire systématique employés, sont de même présentés à la Figure 4.

Les comptages de cellules en forme de bâtonnets pour chaque sujet animal sont présentés à la Figure 4A [souris assorties rd/rd ayant reçu une injection de PBS et de GDNF (1-10), et souris rd/rd n'ayant pas subi d'intervention
20 chirurgicale (11-15)]. Les nombres de bâtonnets immunomarqués à l'opsine entre les différentes souris sont à l'évidence variables, mais dans chaque cas le traitement par GDNF a donné lieu à des comptages cellulaires plus élevés.

Il existait un certain lien entre l'intensité d'effet protecteur et l'état fonctionnel, étant précisé que 3 souris sur 4 chez lesquelles un ERG était
25 détectable (Figure 5A, numéros 3, 4 et 7) présentaient les plus grandes différences relatives en termes de nombre de bâtonnets [le taux d'augmentation moyen des nombres de bâtonnets entre les animaux ayant reçu une injection de GDNF et de PBS était de 70 % pour le groupe ERG-positif (n=4) et de 34 % pour le groupe ERG-négatif (n=6)]. Le nombre moyen de cellules en forme de bâtonnets dans les
30 yeux ayant reçu une injection de GDNF (moyenne. +/- écart type = 89232 +/- 8033) avait augmenté de 46 % par rapport à ce qui a été observé pour des yeux ayant reçu une injection de PBS (61165 +/- 3259), et de 98% par rapport aux yeux témoins n'ayant pas reçu d'injection (44958 +/- 1378) (Figure 5B). Ces gains étaient hautement significatifs statistiquement parlant. Il faut noter également que
35 l'injection de PBS a entraîné une augmentation des nombres de bâtonnets (+36 %) en comparaison avec les yeux non traités.

c) Expression de l'ARNm de GDNF chez les souris rd/rd :

- 9 -

Afin d'étudier le rôle éventuel du GDNF comme facteur trophique endogène des bâtonnets, on a analysé l'expression d'ARNm de GDNF endogène dans les rétines de souris (Figure 6A).

La piste 1 montre l'expression durable en plus grandes quantités d'ARNm de GDNF dans les rétines en comparaison avec le reste de l'oeil (rapport 6/4). Des souris rd/rd âgées de 12 jours ont exprimé de l'ARNm de rhodopsine spécifique de bâtonnets suivant des taux comparables à ceux de souris C57 âgées de 35 jours (pistes 1 et 10 - 11). Des baisses marquées du taux d'expression d'ARNm de rhodopsine ont été observés chez les souris rd/rd entre les jours 12 et 22 (comparer la piste 1 aux pistes 2, 3) et entre les jours 22 et 120 (comparer la piste 4 à la piste 9). Durant tout l'intervalle d'étude, les taux d'expression d'ARNm de GDNF et ceux de l'enzyme d'entretien G6PDH sont demeurés inchangés (pistes 12 - 20), et étaient comparables aux taux d'expression respectifs dans les yeux de souris C57 au jour 35 (pistes 21, 22).

15 3) Discussion

Les résultats précités démontrent notamment un effet stimulateur des injections intraoculaires du facteur neurotrophique GDNF sur le taux de survie des photorécepteurs de type bâtonnet chez la souris rd/rd. Cet effet a été mis en évidence à la fois en procédant à des analyses immunohistochimiques et morphométriques et en mesurant des réponses photo-induites. La correspondance générale entre le degré de protection et l'état fonctionnel suggère que même de légères augmentations du nombre de photorécepteurs peuvent avoir une importance considérable sur le plan fonctionnel.

Cette constatation permet de rapporter de manière formelle que l'application d'un facteur de croissance neurotrophique et plus particulièrement du GDNF contribue à améliorer la fonction rétinienne dans un modèle animal de la dégénérescence rétinienne proche de la RP humaine.

Dans la présente étude, l'injection de PBS seul a induit un léger effet protecteur, mais n'a pas conduit à une amélioration fonctionnelle décelable.

Les résultats précités confortent l'hypothèse que le GDNF constitue l'un des quelques facteurs neurotrophiques identifiés affectant la survie des photorécepteurs de type bâtonnet dans les dégénérescences rétiniennes héréditaires dans lesquelles le gène défectueux est localisé dans le bâtonnet.

On notera que les critères tels que la chronologie et le choix du site d'injection oculaire sont essentiels et que l'approche méthodologique utilisée dans la présente étude est probablement tout aussi déterminante. La méthode stéréologique de comptage, développée à l'origine pour évaluer le nombre de

- 10 -

neurones dans les zones cérébrales (Gundersen et al., 1988 ; 96, 379 / Coggeshall et Lekan, Journal of Comparative Neurology 1996 ; 364 : 6-15), permet une estimation précise non biaisée des populations totales de cellules, réduisant fortement la variabilité induite par des différences locales (hémisphère supérieur par opposition à l'hémisphère inférieur, site d'injection). Grâce à cette méthode, il est possible de cribler de manière fiable les effets de divers composés thérapeutiques sur la survie de photorécepteurs, notamment chez la souris rd/rd.

Les tests décrits ci-dessus et illustrés par les dessins annexés montrent qu'il y a diminution en amplitude d'ERG chez la souris rd/rd comme décrit dans plusieurs études précédentes.

La détection d'un signal ERG dans les yeux ayant reçu une injection de GDNF indique que la fonction visuelle a été conservée dans ces rétines. Cette observation physiologique est corrélée dans la plupart des cas avec de très fortes hausses relatives du nombre de bâtonnets.

Par ailleurs, il avait été démontré précédemment que la greffe de photorécepteurs de type bâtonnets a des effets protecteurs sur la survie des cônes dans le modèle de souris rd/rd et suggéré que cet effet était médié par un facteur diffusible libéré par les bâtonnets (Mohand-Saïd et al., Ophtal Research, 1997 ; 29, 290). Une preuve complémentaire à l'existence de tels signaux diffusibles produits par des rétines normales et influençant la survie des cônes a été obtenue en utilisant des modèles de co-culture (Mohand-Saïd et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1998, Vol. 95 (14), 8357-8362).

Ceci suggère que la survie observée des bâtonnets après administration de GDNF doit normalement conduire à la survie de cônes nécessaire à la vision diurne.

Bien que le GDNF exogène protège les photorécepteurs de type bâtonnet, il est peu probable qu'il représente ce signal endogène et cela pour plusieurs raisons. L'expression de GDNF persiste dans les rétines de souris rd/rd même après perte totale des bâtonnets, ce qui indiquerait que le GDNF ne s'exprime pas dans ces cellules (bien que son expression puisse être modulée positivement dans les cellules rétinienne internes durant la dégénérescence des photorécepteurs comme cela a été démontré en cas de lésion rétinienne dans le cas de FGF-2 et de CNTF). Comme il a été démontré que l'effet promoteur de survie des cônes est aboli à la suite de la perte des photorécepteurs dans la rétine rd/rd (Mohand-Saïd et al., Ophtalmic Res. 1997 ; 29 : 290-297), l'absence de GDNF n'est donc pas à l'origine de la dégénérescence des cônes secondaire à la perte des bâtonnets. Le GDNF endogène ne suffit pas à inverser le processus apoptotique

- 11 -

dans les bâtonnets mutants, et pourrait avoir des fonctions autres que la survie des photorécepteurs dans la rétine des souris. Bien que son expression ne suffise pas à prévenir la perte de photorécepteurs, son administration au moyen d'un système de délivrance de gènes comme cela a été entrepris avec succès dans un modèle de la
5 maladie de Parkinson chez le rat (Clarkson, 1995) pourrait être utile pour protéger de la dégénérescence rétinienne.

La description ci-dessus mentionne l'invention plus particulièrement en relation avec le GDNF utilisé pour le traitement de la rétinite pigmentaire mais, comme déjà indiqué précédemment, l'invention peut être étendue au moins à
10 certains autres membres composés de la famille du GDNF pour le traitement d'autres types de dégénérescence rétinienne.

Il convient de noter que l'invention n'est pas limitée au mode de réalisation, notamment au mode d'application de la molécule, décrit. Des modifications restent possibles, notamment du point de vue de la constitution des
15 divers éléments ou par substitution d'équivalents techniques, sans sortir pour autant du domaine de protection de l'invention.

REVENDICATIONS

1) Facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF), ou substance de la famille comprenant ledit facteur, pour utilisation pour l'obtention d'un agent actif protecteur pour le traitement des dégénérescences rétiniennes, plus particulièrement de la rétinite pigmentaire (RP) chez l'homme.

5 2) Agent actif protecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales consiste en du GDNF exogène recombinant sous une forme administrable par injection.

10 3) Agent actif protecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le GDNF est libéré in situ par des fibroblastes implantés par greffage, après transfection.

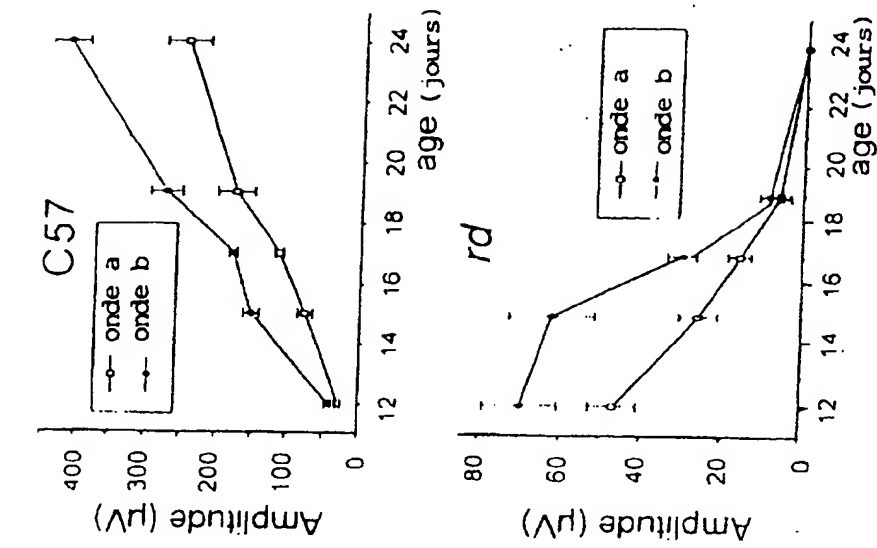


Fig-1B

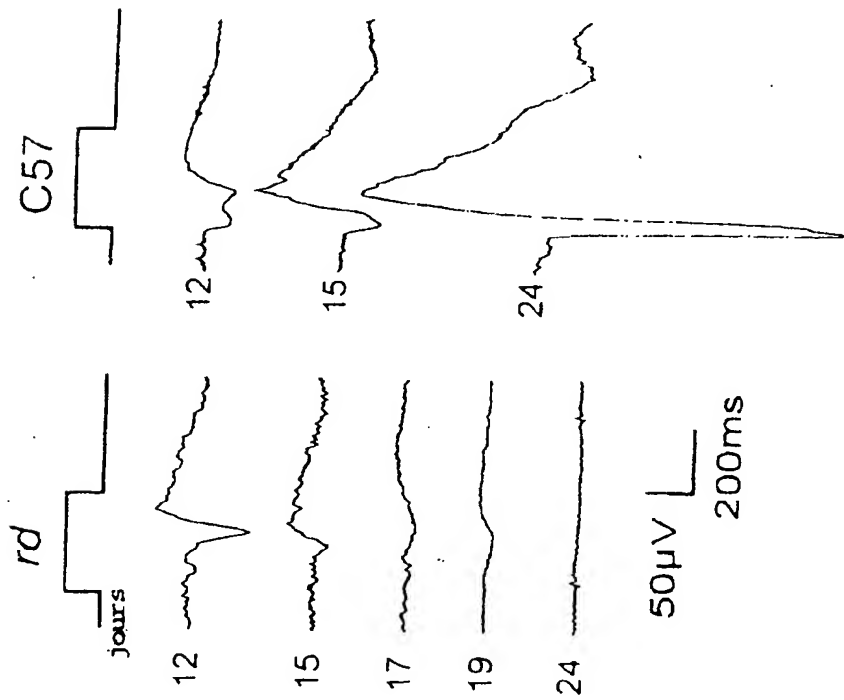
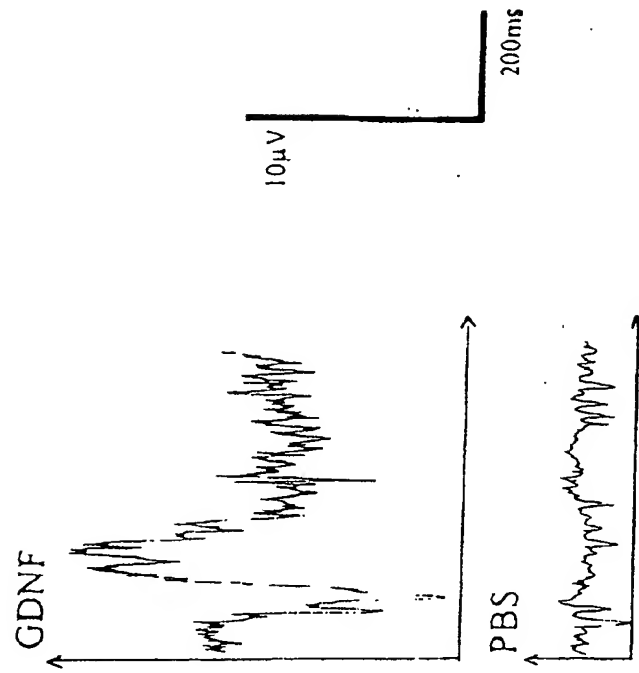
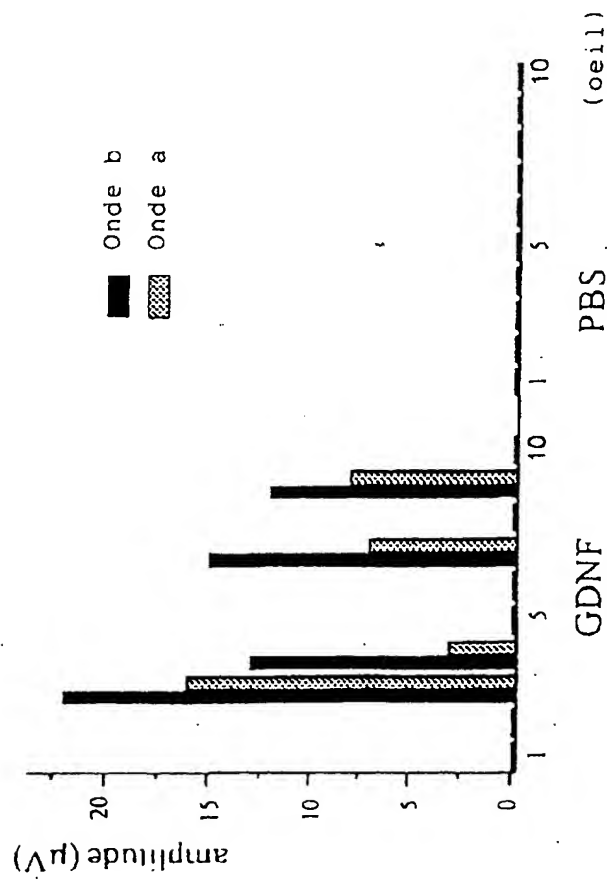


Fig-1A

Fig-1



F109-2B



F109-2A

F109-2

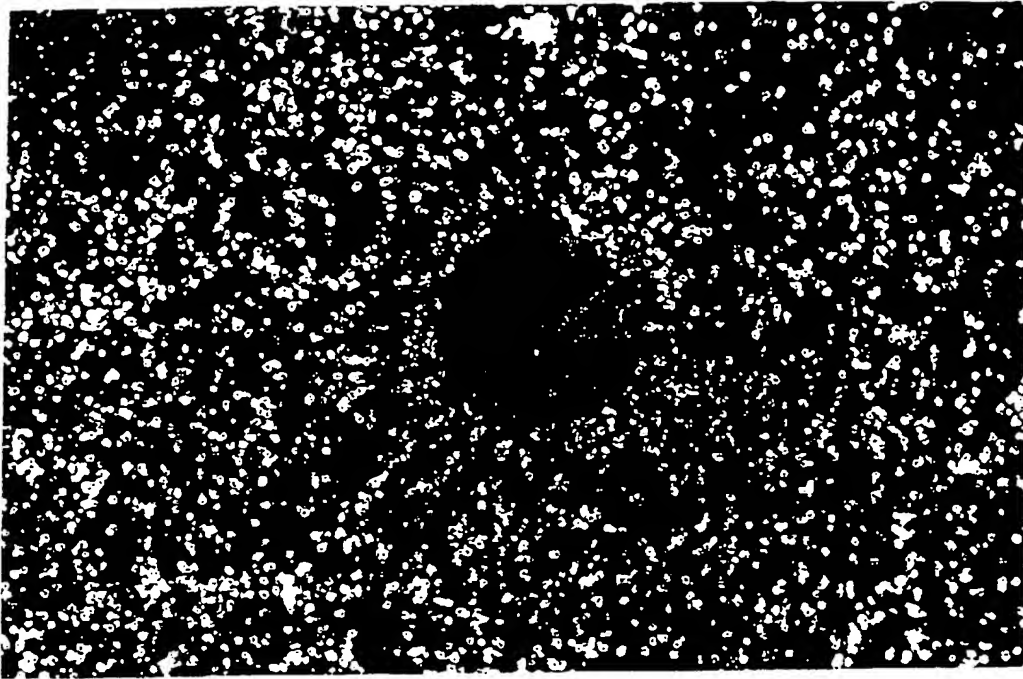


Fig-3A

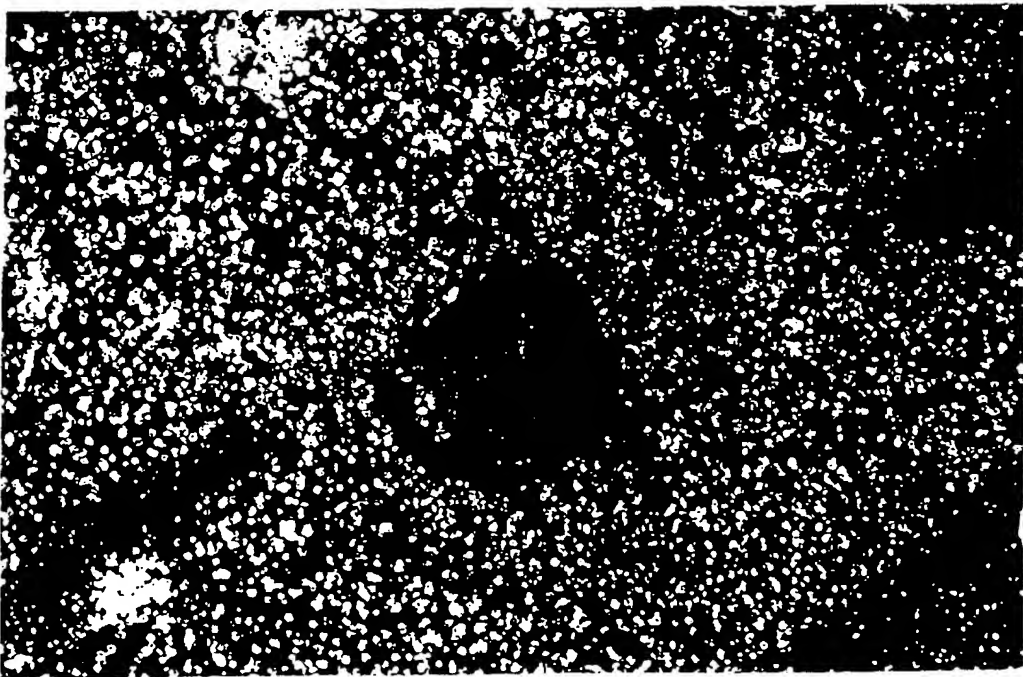


Fig-3B

Fig-3

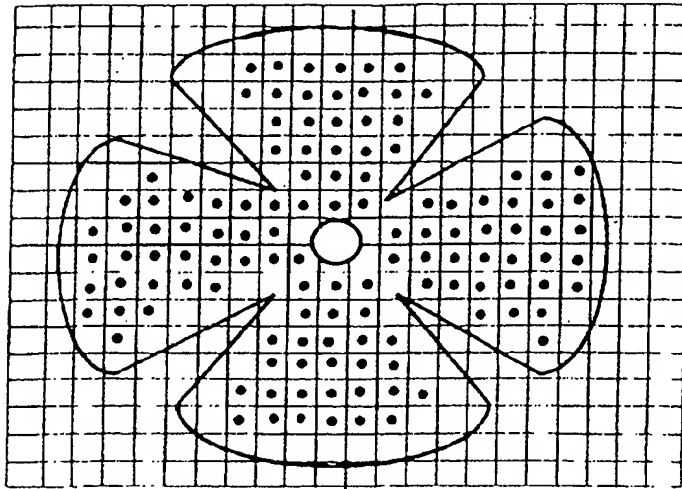


Fig-4A

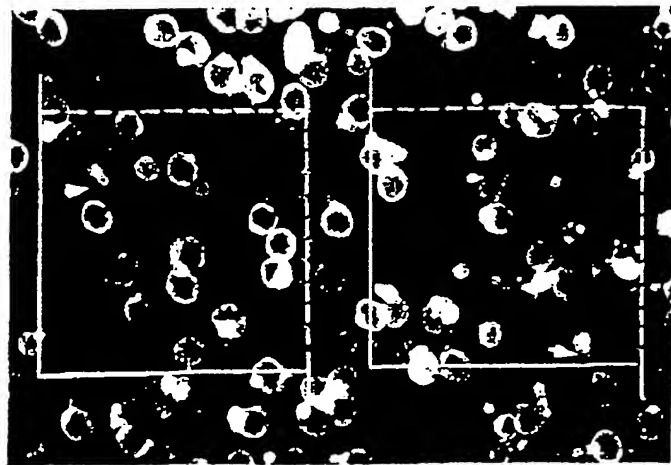
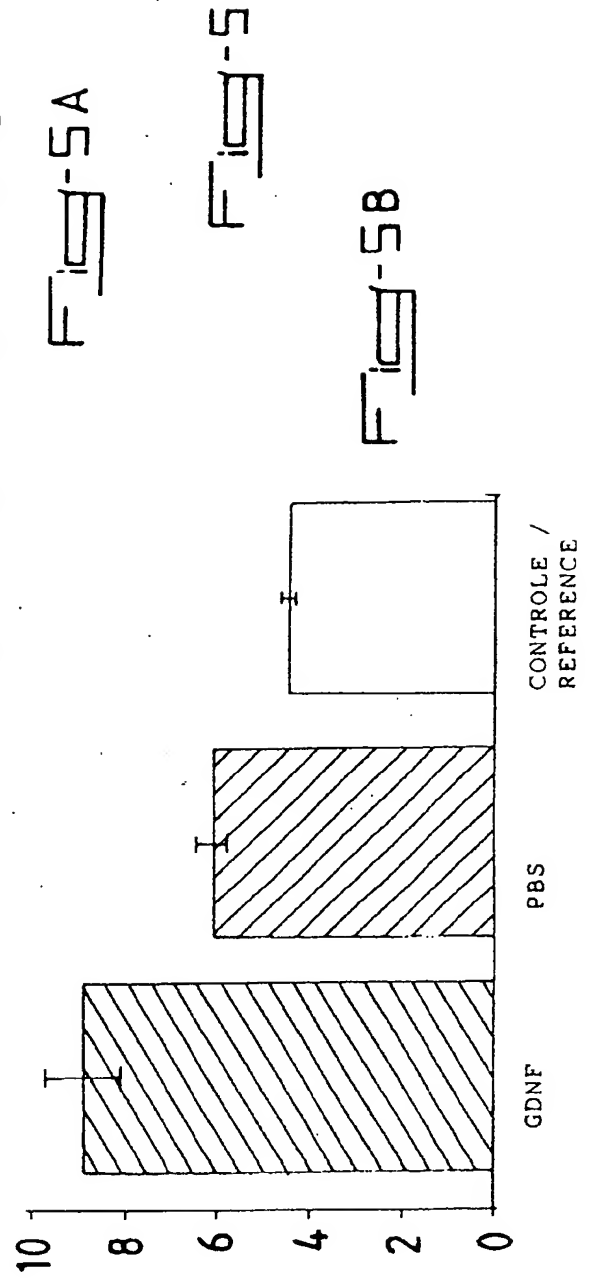
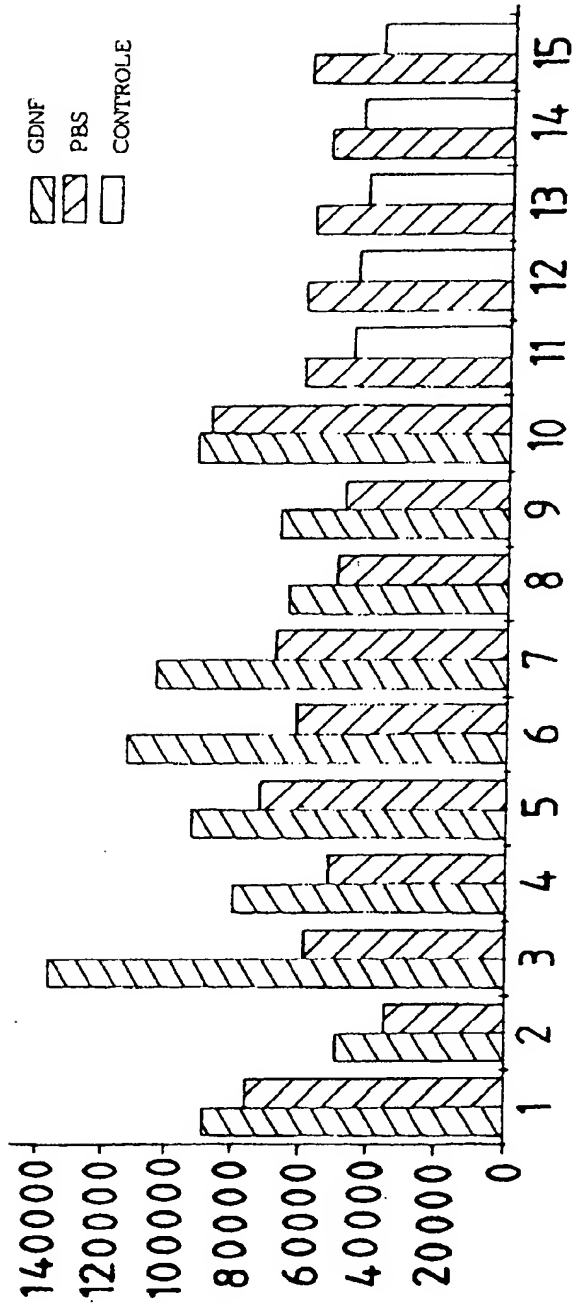


Fig-4B

Fig-4



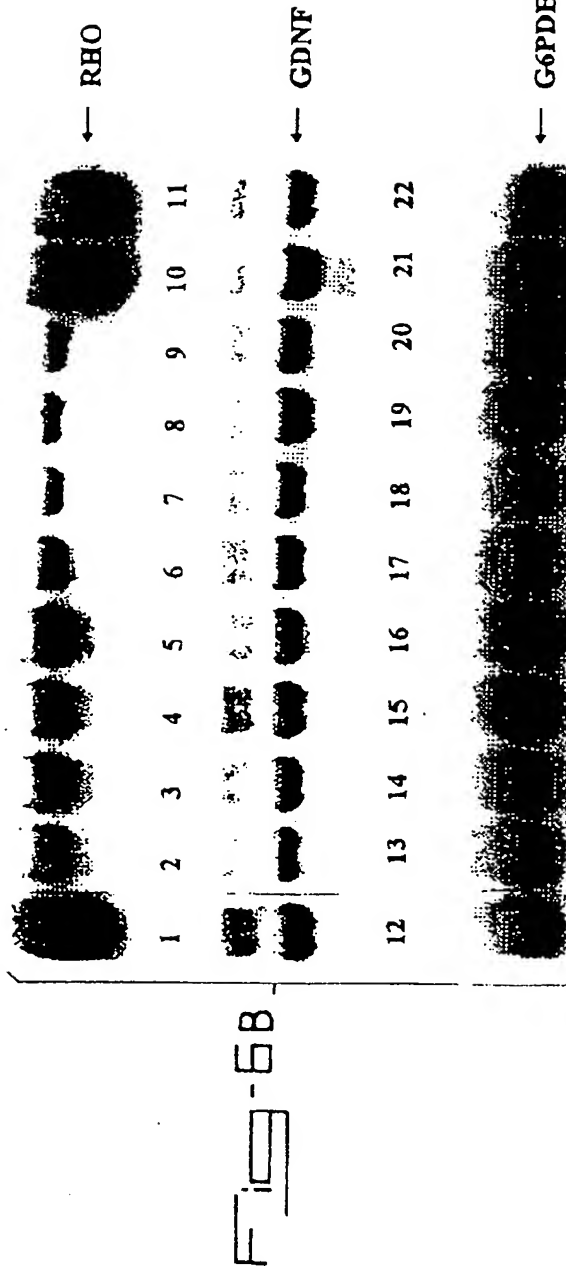
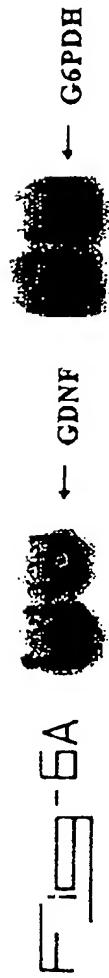


Fig-6

REPUBLIQUE FRANÇAISE

84898

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 570449
FR 9813473

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 97 19694 A (AMGEN, INC.) 5 juin 1997 (1997-06-05) * page 6, ligne 14 - ligne 28; revendications; exemples * * page 10, ligne 17 - ligne 23 * * page 29, ligne 20 - page 30, ligne 4 * * page 9, ligne 10 - ligne 18 * * page 31, ligne 15 - ligne 18 *	1-3
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
24 août 1999		Ryckebosch, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou amorce-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03 87 (P04C13)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.